

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-017184

(43)Date of publication of application : 23.01.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 31/00
A61K 45/00
C12Q 1/68

(21)Application number : 11-198032

(71)Applicant : IGAKU SEIBUTSUGAKU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 12.07.1999

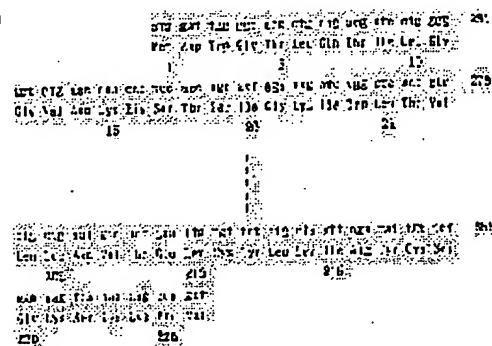
(72)Inventor : NOJIMA HIROSHI
ITO AKIHIKO

(54) CANCER METASTASIS EXAMINATION METHOD AND SCREENING OF CANCER METASTASIS SUPPRESSING AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable the search for a cancer metastasis suppressing agent, etc., using a new cancer metastasis ability as an index and examine the cancer metastasis ability by comparing the expression level of a connexin 26 gene of a cancer cell with the expression level of the gene in normal cell.

SOLUTION: This examination method for cancer metastasis ability uses the expression level of connexin 26 as an index. The cancer metastasis ability of a cancer cell is examined by using a new cancer metastasis ability index and enabling the use of the index for the screening of a cancer metastasis suppressing agent by using a primer composed of a DNA having a chain length of 15 nucleotides and specifically hybridizing a DNA having a base sequence of formula with an mRNA coding for a region exhibiting a gap bonding activity of at least connexin 26 as the expression level of connexin 26 gene in a cancer cell, quantitatively analyzing by RT-PCR method, etc., and comparing the result with a value obtained by the quantitative determination of the expression level of connexin 26 gene in a normal cell.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-17184
(P2001-17184A)

(43) 公開日 平成13年 1 月23日 (2001.1.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/00	6 3 5	A 6 1 K 31/00	6 3 5 B 4 B 0 6 3
45/00		45/00	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平11-198032

(22) 出願日 平成11年 7 月12日 (1999. 7. 12)

(71) 出願人 390004097
株式会社医学生物学研究所
愛知県名古屋市中央区丸の内 3 丁目 5 番10号
住友商事丸の内ビル 5 F

(72) 発明者 野島 博
大阪府豊中市西緑が丘 1 - 4 - 27 - 123

(72) 発明者 伊藤 彰彦
大阪府豊中市上新田 3 - 6 - 12 - 804

(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志 (外 1 名)

F ターム (参考) 4B024 AA12 BA80 CA09 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ53 QR55
QS34 QX01
4C084 AA17 ZB262

(54) 【発明の名称】 癌転移能検査方法、および癌転移抑制薬のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 癌転移能の指標を見出し、この指標に基づく癌転移能の検査方法と、癌転移抑制薬のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 コネキシン 26 の発現レベルを指標とする癌転移能の検査方法が提供される。また、コネキシン 26 に対する結合活性に基づく、癌転移抑制薬のスクリーニング方法を提供する。コネキシン 26 (connexin 26) の発現レベルは、癌の転移能の高さに応じて高まる新規なマーカーである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌細胞におけるコネキシン26遺伝子の発現レベルを正常細胞のコネキシン26遺伝子の発現レベルと比較する工程を含む、癌転移能の検査方法。

【請求項2】 コネキシン26遺伝子の発現レベルを、コネキシン26をコードするmRNAの定量によって評価する請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 mRNAにおける、少なくともコネキシン26のギャップ結合活性を示す領域をコードしている領域を定量する請求項2に記載の検査方法。

【請求項4】 コネキシン26遺伝子の発現レベルを、癌細胞に含まれるコネキシン26タンパク質の定量によって評価する請求項1に記載の検査方法。

【請求項5】 コネキシン26遺伝子の発現レベルを、コネキシン26タンパク質を特異的に認識する抗体による免疫学的な定量方法によって評価する請求項4に記載の検査方法。

【請求項6】 コネキシン26遺伝子の発現レベルを、体液中のコネキシン26タンパク質を指標として評価する工程を含む癌転移能の検査方法。

【請求項7】 配列番号：1に示す塩基配列を持つDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNAを含む、癌転移能の検査用試薬。

【請求項8】 配列番号：2に示すアミノ酸配列を持つタンパク質と特異的に結合する抗体を含む、癌転移能の検査用試薬。

【請求項9】 次の工程を含む、癌の転移抑制薬のスクリーニング方法。

a) コネキシン26の少なくともギャップ結合活性を示す領域を含むタンパク質を提供する工程

b) 候補化合物をa)のタンパク質に接触させる工程、および

c) a)のタンパク質に結合する候補化合物を選択する工程

【請求項10】 候補化合物がランダムな塩基配列からなるRNAライブラリーである請求項9に記載のスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項9または請求項10に記載の方法により単離しうる化合物を主成分として含有する癌の転移抑制薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、癌の転移能の試験方法、ならびに癌の転移を抑制する活性を持つ化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 癌の進行にともなって、癌の転移が起きる。癌の転移は、ある組織で増殖した癌が、その組織を離れて他の部位に浸潤し増殖を開始する現象を言う。転

移した癌を治療しえない場合には、いずれ何らかの形で患者の命を奪う原因につながる。癌が転移する能力を持つことは、一般に癌の悪性化と呼ばれている。癌の悪性化の程度を把握し、その転移を防ぐことは、癌の早期発見を可能とする診断方法や、発見された癌を取り除く治療方法と並んで、癌を克服するための重要な研究テーマである。

【0003】 癌の転移は、原発巣からの離脱、癌細胞の組織間の移動、そして再増殖という複数のステップからなっている。実際には、この一連の過程には複雑な機構が関与しているとされており、その全体像は未だに解明されていない。たとえば、マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)と呼ばれる一群のプロテアーゼの活性化は、癌の発生や悪性化と密接に関連しているといわれている。原発巣から離脱して血管内に侵入するとき、そして転移先に浸潤していくとき、細胞外基質(Extracellular matrix; ECM)の分解活性は重要な要素である。MMPは、このECMの分解に深く関与しているとされている。そのためMMP阻害剤には、抗癌剤として開発を進められているものもある。また細胞接着分子であるインテグリンは、癌の転移において、転移活性と転移先の臓器特異性に関与するとする報告がある。しかし先に述べたように、癌の転移には未解明の部分が多く残されており、上記のようなこれまでに明らかにされた機構のみでは、その全体像の説明は不可能である。また、癌の転移を防ぐ治療薬の開発においても、更に詳細な転移のメカニズムの解明が必要である。癌の転移をいくつかの異なったステップの積み重ねの結果とするなら、各ステップの達成に必要な因子を明らかにし、それらの活性を総合的に把握することが癌の転移能を正確に評価することにつながる。また転移の予防においては、各ステップを構成する主要な因子を個別に阻害することにより、確実な転移の防止が達成されることになる。特に、一般に転移の危険が大きいとされているメラノーマや、肺小細胞癌において、その転移能を支えている因子を解明することができれば、診断や治療におおいに貢献するものと思われる。

【0004】 現在までに報告されている癌転移関連因子のほとんどはディファレンシャル・ディスプレイ法(differential display)によって発見されている。本発明の実施例において用いたF10細胞とBL6細胞を利用し、ディファレンシャル・ディスプレイ法によって癌の転移に関連する遺伝子の単離を試みた報告もある(Cancer Res. 56, 875-879, 1996)。しかし単離された遺伝子の多くは、いわゆるハウスキーピング遺伝子であり、ディファレンシャル・ディスプレイ法の弱点である効率の低さを表している。

【0005】 一方、細胞間の結合様式の一つとして、ギャップ結合(Gap junction)が知られている。ギャップ結合は、動物の組織の多くで見られる細胞間の結合様式である。ギャップ結合では、隣接する細胞が互いに隙間を

維持して結合し、結合部分にはコネクソンによって構成された細胞間を連絡する通路が形成されている。例えば cAMP のような分子量が 1000Da 以下の低分子量の物質は、この連絡通路を介して細胞間での移動が可能となっている。一方、通常のタンパク質や核酸は通過することはできない。この現象を利用して、ギャップ結合アッセイと呼ばれる分析方法が開発されている。すなわち、一方の細胞に分子量 1000-1500 程度の蛍光色素を保持させ、他の細胞と接触させる。両者の間でギャップ結合が形成された場合には、蛍光色素が他方の細胞に移動する（これを共役と言う）現象が観察される。ギャップ結合アッセイの中でも、マーカーとして蛍光色素を用いる場合には、特に色素トランスファーアッセイと呼ばれることもある。

【0006】コネクソンは、コネキシン (connexin) と呼ばれる互いに構造が類似したタンパク質群で構成されている。現在までに 12 種のコネキシンが同定されており、 α タイプと β タイプとに分類されている。特定の細胞には特定のコネキシンが発現していることが知られている一方、コネキシン自体は多くの異なる種類の細胞で発現しており、進化的にも良く保存されていることから、細胞社会の成立に重要な機能を担っていると考えられている。近年の分子遺伝学の進歩により、いくつかの遺伝性疾患とコネキシンの関係が明らかになった。たとえば、 $\beta 1$ コネキシン / コネキシン 32 (Cx32) は遺伝性神経変性疾患である X-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX) の原因遺伝子である (Science 1993 Dec 24; 262 (5142): 2039-2042)。また $\alpha 1$ コネキシン / コネキシン 43 (Cx43) は、心臓の逆位などの症候を呈する遺伝性疾患である viscerotaxial heterotaxia syndrome (VAH) の原因遺伝子とされている (N Engl J Med 1995 May 18; 332 (20): 1323-1329)。そして $\beta 2$ コネキシン / コネキシン 26 (Cx26) は、遺伝性難聴疾患である autosomal recessive non-syndromic deafness (DFNB1) (Nature 1997 May 1; 387 (6628): 80-83) と autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA) (Nature 1998 May 28; 393 (6683): 319-320) の原因遺伝子であることが明らかになった。

【0007】ところで細胞増殖の抑制シグナルは、ギャップ結合を通して直接隣あった細胞に伝えられるという仮説が提唱されてきた。この仮説を裏付けるように正常乳腺細胞と乳癌細胞とのサブトラクション法により、正常乳腺細胞には発現しているが乳癌細胞には発現していない遺伝子として、コネキシン 26（以下、Cx26 と省略する場合もある）が単離された (Proc Natl Acad Sci USA 1991 Apr 1; 88 (7): 2825-2829)。実際、実験的に Cx26 を乳癌細胞株に強発現させることにより増殖は抑制され、ヌードマウスにおいての造腫瘍活性も顕著に低下し、Cx26 は乳癌において癌抑制遺伝子としての機能があることが報告された。さらに HeLa 細胞においても Cx26

は細胞増殖を抑制すると同時に、癌の遺伝子治療時に遺伝子が導入された細胞のみならず、周辺の細胞も殺すというバイスタンダー効果を増強することが報告された (Cancer Res 1997 Jul 15; 57 (14): 2929-2932)。しかし原発性の脳腫瘍では Cx26 と Cx43 が発現しており (Neurosurgery 1999 Feb; 44 (2): 361-369)、正常乳腺では Cx26 の発現は非常に低い一方、非定型型の乳癌の 56% では Cx26 の発現が増強していた (J Pathol 1998 Jan; 184 (1): 37-43) という報告があるなど、人為的な実験から得られた結果と臨床サンプルを用いた結果とは必ずしも一致していないのが現状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、癌の転移能を反映する新たな指標を提供することである。そして本発明は、この指標を利用して、癌の転移能の検査方法、並びに癌の転移を抑制するための薬剤をスクリーニングする方法の提供を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、転移能決定因子を同定するため、マウス由来の BL6 細胞（自然高転移性）と F10 細胞（自然低転移性）との間で cDNA ライブラリーのサブトラクションを行い、BL6 細胞において高発現する 20 数種の遺伝子を単離した。サブトラクション法には、転写標的遺伝子群の包括的、かつ能率的なクローニングが可能な、厳密な方法を採用した。この方法は本発明者らが開発した (Kobori M, Ikeda Y, Nara H, Kumegawa M, Nojima H and Kawashima H: Large scale preparation of a subtracted cDNA library. Genes Cells 3, 459-475, 1998) もので、高品質な cDNA ライブラリーを同じドライバー mRNA に対して繰り返し差分化を行う。この方法によって癌転移に関連する遺伝子は濃縮され、単離効率が著しく向上する。マウス・メラノーマ細胞株 B16 の亜株には、実験的転移能（静脈注射）と自然転移能（皮下注射）のいずれをも有する BL6 細胞と、実験的転移能は有するが自然転移能は有しない F10 細胞とがある。実験的転移能に比べて自然転移能はヒトの悪性癌により近い性質を持っていると考えられ、本発明のサブトラクションには好適な組み合わせである。そして、単離された遺伝子のうち、コネキシン 26 をはじめとするいくつかの遺伝子と転移性の間に一定の関係があることを発見した。更に、これらの遺伝子の全長 cDNA をクローニングし F10 細胞に導入してその自然転移能を検定したところ、コネキシン 26 を導入した細胞においてのみ、BL6 細胞相当の高い転移性が確認された。また、この効果が本当に コネキシン 26 の過剰発現によるものかどうかを確認するためコネキシン 26 のドミナント・ネガティブ・フォームを BL6 細胞に導入して BL6 細胞が本来持っている自然転移能を阻害するか否かについて調査した。その結果、ドミナント・ネガティブ・フォームの発現量が、もともと BL6 細胞に存在

する内在性のコネキシン26量を凌駕するにつれて自然転移能を阻害した。

【0010】本発明者らは、これらの知見に基づいて本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の癌転移能検査方法と、癌転移抑制薬のスクリーニング方法に関する。

〔1〕癌細胞におけるコネキシン26遺伝子の発現レベルを正常細胞のコネキシン26遺伝子の発現レベルと比較する工程を含む、癌転移能の検査方法。

〔2〕コネキシン26遺伝子の発現レベルを、コネキシン26をコードするmRNAの定量によって評価する〔1〕に記載の検査方法。

〔3〕mRNAにおける、少なくともコネキシン26のギャップ結合活性を示す領域をコードしている領域を定量する〔2〕に記載の検査方法。

〔4〕コネキシン26遺伝子の発現レベルを、癌細胞に含まれるコネキシン26タンパク質の定量によって評価する〔1〕に記載の検査方法。

〔5〕コネキシン26遺伝子の発現レベルを、コネキシン26タンパク質を特異的に認識する抗体による免疫学的な定量方法によって評価する〔4〕に記載の検査方法。

〔6〕コネキシン26遺伝子の発現レベルを、体液中のコネキシン26タンパク質を指標として評価する工程を含む癌転移能の検査方法。

〔7〕配列番号：1に示す塩基配列を持つDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNAを含む、癌転移能の検査用試薬。

〔8〕配列番号：2に示すアミノ酸配列を持つタンパク質と特異的に結合する抗体を含む、癌転移能の検査用試薬。

〔9〕次の工程を含む、癌の転移抑制薬のスクリーニング方法。

a) コネキシン26の少なくともギャップ結合活性を示す領域を含むタンパク質を提供する工程

b) 候補化合物をa)のタンパク質に接触させる工程、および

c) a)のタンパク質に結合する候補化合物を選択する工程

〔10〕候補化合物がランダムな塩基配列からなるRNAライブラリーである〔9〕に記載のスクリーニング方法。

〔11〕〔9〕または〔10〕に記載の方法により単離センス側プライマー：

5'-GCGAATTCAGGTGTAATTTACCAAAAATA-3' (配列番号：3)

アンチセンス側プライマー：

5'-GCGCTCGAGCACCAAGCTTTCATCCTGG-3' (配列番号：4)

試料が癌細胞である場合には、細胞からmRNAを抽出し、RT-PCRを実施することができる。あるいは、インサイチ

しうる化合物を主成分として含有する癌の転移抑制薬。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明は、癌細胞におけるコネキシン26遺伝子の発現レベルを正常細胞のコネキシン26遺伝子の発現レベルと比較する工程を含む、癌転移能の検査方法である。本発明において、癌転移能の検査方法とは、具体的には以下のような検査を意味する。第一に、ある癌がどの程度の転移能を有するか、定量的な評価を与える。第二に、癌の転移が起きている可能性を知るための指標を与える。第三に、コネキシン26を標的とする癌の転移の防止が可能かどうかの指標を与える。本発明の癌の転移能の検査方法とは、これらの検査方法のいずれをも含むものである。コネキシン26とは、ヒトにおいては配列番号：2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質である。ヒト・コネキシン26は、配列番号：1に示す塩基配列を持つ遺伝子によってコードされていることが明らかされている(J. Cell Biol. 118, 1213-1221, 1992)。なお、コネキシン26のような真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば多型現象が認められることがある。多型現象は遺伝子の塩基配列に見出される小規模な塩基の置換で、通常、塩基の置換がタンパク質の活性に与える影響は小さい。このような多型等によって塩基配列やアミノ酸に小規模な変異を生じたコネキシン26も、それが癌の転移能に相関している限り、本発明におけるコネキシン26に含まれる。本発明において、コネキシン26はヒト由来のものに限定されない。ヒト以外では、マウス(Eur. J. Cell Biol. 58, 81-89, 1992)、あるいはラット(J. Cell Biol. 109 (6 Pt 2), 3391-3401, 1989)におけるホモログが公知である。これら、コネキシン26のホモログは、それぞれの種において癌の悪性度の指標とすることができる。

【0012】本発明において、コネキシン26遺伝子の発現レベルは、mRNAの転写量、タンパク質量、あるいはコネキシン26の生物学的な活性などに基づいて評価することができる。これらの手法は、いずれも公知の方法にしたがって実施することができる。たとえばmRNA量は、RT-PCR、FISH法、あるいはノーザンブロットングによって定量することができる。これらの手法に必要なプライマーやプローブは、たとえば配列番号：1に示す塩基配列(ヒトの場合)に基づいて、当業者に公知の方法で設計することができる。以下にRT-PCRに用いることができるコネキシン26をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーを例示する。

ユ RT-PCRやFISH法により、細胞内のmRNAレベルを直接的に評価することもできる。

【0013】次に、タンパク質量は、コネキシン26に特異的な抗体を利用したイムノアッセイによって知ることができる。コネキシン26に特異的な抗体は、たとえばZymed社などから商業的に供給されている。あるいは配列番号：2のアミノ酸配列を持つタンパク質を免疫原として、公知の方法によりポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を得ることもできる。免疫原として、配列番号：2のアミノ酸配列から選択した、コネキシン26に特異的なアミノ酸配列を含む合成ペプチドを用いることもできる。イムノアッセイには様々なバリエーションが知られているが、抗原性物質のイムノアッセイであれば操作性、必要な感度、あるいは試料の特徴等を考慮して任意の方法を採用することができる。たとえば癌細胞を直接試料として用いる場合、固定した細胞標本に対して免疫染色を施すことにより、コネキシン26の発現レベルの比較が可能である。あるいは、癌細胞の細胞ライゼートを試料としてELISA法やウエスタンブロッティング法を行い、コネキシン26の発現レベルを把握することができる。

【0014】コネキシン26の発現レベルは、癌細胞のみならず、体液中においても比較することが可能である。すなわち、たとえば血中におけるコネキシン26のmRNAやタンパク質レベルを測定することにより、コネキシン26の発現レベルを知ることができる。癌の転移において、血流中への癌細胞の離脱は重要なステップとなっている。この離脱した癌細胞に由来するコネキシン26を血中において比較することは、癌の転移の検査において重要な情報を与える。血中のmRNAの量は、RT-PCRにより知ることができる。またタンパク質レベルについては、ELISAのようなイムノアッセイにより測定することができる。得られたコネキシン26のmRNA（またはタンパク質）量は、健常者の測定値と比較することにより、癌の転移能が評価される。

【0015】以上のような、コネキシン26の発現レベルを知るために必要な成分は、癌の転移能検査用試薬として有用である。すなわち、配列番号：1に示す塩基配列を持つDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNAは、ヒトのコネキシン26のmRNA量を測定するためのプライマーやプローブとして利用することができる。オリゴヌクレオチドは、検出を容易にするために予め標識しておくことができる。オリゴヌクレオチドを、フルオレセインイソチオシアネートのような蛍光色素、 ^{32}P 等の放射性同位元素、あるいはジギキシンのような間接標識によって標識する方法は公知である。あるいは配列番号：2に示したアミノ酸配列を持つタンパク質と特異的に結合することができる抗体は、ヒト・コネキシン26タンパク質の免疫学的な検出に利用することができる。この抗体についても、検出を容易とするために予め標識しておくことができる。抗体を、ペルオキシダーゼのような酵

素、フルオレセインイソチオシアネートのような蛍光色素、 ^{125}I 等の放射性同位元素、あるいはビオチンのような間接標識によって標識する方法は公知である。本発明による癌転移能の検査用試薬には、コネキシン26を既知濃度で含む標準試料、試料の希釈や洗浄に用いる反応用緩衝液、標識成分の検出のために必要な付加的な試薬等を組み合わせてキットとすることができる。

【0016】本発明は、癌の転移能の検査方法に加えて、コネキシン26を標的とする癌の転移抑制薬のスクリーニング方法をも提供する。すなわち本発明は、次の工程を含む、癌の転移抑制薬のスクリーニング方法である。

- a) コネキシン26の少なくともギャップ結合活性を示す領域を含むタンパク質を提供する工程
- b) 候補化合物をa)のタンパク質に接触させる工程、および
- c) a)のタンパク質に結合する候補化合物を選択する工程

本発明において、コネキシンとは配列番号：2のアミノ酸配列を持つヒト由来のコネキシン26の他、マウスやラット等のような他の主に由来するものであることもできる。しかし、ヒト由来のものを用いることにより、ヒトにおけるより高度な有効性を持つ化合物のスクリーニングが期待できる。コネキシン26は、完全な分子のみならず、そのギャップ結合形成領域のみを用いることもできる。ヒト・コネキシン26においては、細胞外ループE1（N末端から数えて41-67位のアミノ酸配列）とE2（N末端から数えて159-189位のアミノ酸配列）がコネクソンどうしの結合に必要である（Cell 1996 Feb 9; 84 (3): 381-388）。

【0017】本発明のスクリーニング方法において、コネキシン26または候補化合物のいずれかを固相に固定化し、他方を標識することにより、スクリーニングを効率的に行うことができる。すなわち、たとえばコネキシン26（またはギャップ結合ドメイン）を固定化した担体に、標識した候補化合物を接触させ、担体への標識の結合に基づいて両者の結合を検出することができる。あるいは、たとえばコンビナトリアルケミストリーによって固相上に合成された候補化合物ライブラリーに対して、標識したコネキシン26（またはギャップ結合ドメイン）を接触させることによって、コネキシン26に結合する化合物をスクリーニングすることができる。

【0018】本発明のスクリーニング方法において利用することができる候補化合物には、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、RNAライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、あるいは合成低分子化合物のライブラリーなどが挙げられるが、これらに制限されない。これらの候補化合物の中でも、RNAライブラリーは、きわめて多様性に富むライブラリーを比較的簡単な操作で合成す

ることができるので、候補化合物として望ましい。RNAライブラリーの合成と、このライブラリーのスクリーニングは、一般に次のように行われる。

(1) まずDNA合成機を用いてT7RNAポリメラーゼのプライマー配列(34塩基)と任意の18塩基に挟まれたランダムな配列を持つオリゴヌクレオチドを合成する。25塩基を挟めば $4^{25}=10^{15}$ 程度のランダム性を持つオリゴヌクレオチドの集団を容易に合成できる。

(2) これを鋳型にしてT7RNAポリメラーゼを働かせ、ランダムな塩基配列を持つRNA分子集団を合成する。

(3) これを標的蛋白質を結合させたカラムを塩濃度を高めた状態で通過させ、次に吸着したRNA画分を低塩濃度の条件下で溶出させる。

(4) 溶出したRNAを鋳型にし、18塩基部分をプライマーとして逆転写酵素を働かせてDNAに転換する。

(5) このDNAをPCR法により再び増幅する。

(6) 増幅されたDNAを用いて(1)-(5)のプロセスを何回も繰り返して特異的に結合するRNA分子を純化してゆく。

【0019】このような工程を経てRNAライブラリーから選択された、コネキシン26に結合することができるRNA分子は、アプタマーとして機能する。アプタマーとは、標的蛋白質に特異的に結合して作用する機能性RNAを意味する用語である。ラテン語で適合(fit)するという意味を持つ語(aptus)に因んでアプタマーと呼ばれる。実際に色素、蛋白質(T4DNAポリメラーゼ)などを標的にしたアプタマーが単離されてきた。RNAに転換せずDNAのままこの過程を繰り返してもよいが多様な立体構造を取りうるRNAのほうが遥かに高い確率でアプタマー分子が採取できる。本発明によってスクリーニングされたコネキシン26に結合する化合物は、コネキシン26に結合してそのギャップ結合を阻害する機能を有することから、この化合物を主成分として含有する癌の転移抑制薬とすることができる。

【0020】本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、薬剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体(生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など)とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

【0021】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕差分化cDNAライブラリーからのクローンの単離

自然高転移性のマウス由来メラノーマ細胞株BL6と、自

然低転移性のF10細胞株を用い、サブトラクション法による転移関連遺伝子の単離を行った。操作は次のとおりである。F10とBL6細胞株からグアニジンチオシアネート/CsTFA法を用いて全RNAを抽出し、その後オリゴdTセルロースを用いてpoly(A)⁺ RNAを精製した。リンカープライマー法を用いてcDNAライブラリーを作製し、プラスミドベクターpAP3 neoに挿入した。公知の方法(M. Kobori et al. Genes Cells Vol.3, 459-475, 1998)に従って、BL6細胞株から得られたcDNAライブラリーから、F10細胞株から得られたcDNAライブラリーを差し引いた差分化cDNAライブラリーを構築した。4回、差分化の工程を繰り返した後、約1500クローンを単離した。これらのクローンの中からBL6細胞株においてF10細胞株と比較して転写が亢進しているクローンをノーザンブロット法により選別し、塩基配列を決定した。得られたcDNAの塩基配列はBLASTNアルゴリズムを用いて、htgsデータベースを検索した。その結果、BL6で特に高度な発現が確認された遺伝子はCx26であることが確認された。

【0022】〔実施例2〕コロニーハイブリダイゼーション

2 x 10⁶コロニーをナイロンメンブレンにトランスファーし、Cx26、PP2AB' alpha、ファキニン、TIB23の[α-³²P] dCTP 標識したそれぞれの3' 端部分塩基配列を含むcDNAをプローブとして用いてスクリーニングを行なった。陽性コロニーからプラスミドを精製し翻訳領域に突然変異がないことを塩基配列を決定して確認した。

【0023】〔実施例3〕ウエスタンブロット解析
細胞抽出にあたっては、HertzbergとSkibbents(E. L. Hertzberg and R. V. Skibbents Cell Vol.39, 61-69, 1984)の方法に準じて膜タンパク質を濃縮するためにアルカリ処理を行った。1 μgの細胞全抽出物を10 %SDS-PAGEで展開後、イモビロンメンブレン(ミリポア社製)にトランスファーした。メンブレンを300倍希釈した抗Cx26マウスモノクローナル抗体(Zymed社製)と2時間反応させ、PBSで洗浄後、1000希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(Cappel社製)と反応させた。さらにPBSで洗浄後、メンブレンを化学発光試薬Renaissance(NEN社製)と反応させ、X線フィルムに露光した。同じ試料を展開した10 %SDS-PAGEゲルを銀染色試薬(第一化学社製)の説明書に従って銀染色を行なった。

【0024】〔実施例4〕F10とBL6細胞における様々なコネキシンの発現

(1)細胞株と細胞培養

マウス・メラノーマ細胞株B16のF10亜株とBL6亜株は、テキサス大学Fidler I.J. 博士より提供された。NIH/3T3細胞株はATCC(American Type Culture Collection)より購入した。すべての細胞は10 % 仔牛胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地(増殖培地)で維持した。

形質転換体は2mg/mlのG-418含有増殖培地で維持した。

【0025】(2) ノーザンブロット解析

メラノーマのさまざまなクローン、マウスの組織およびヒト癌組織から抽出した全RNA 5 μ gを1% アガロース-ホルムアルデヒド上で展開し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。これをランダムヘキサマー法で [α - 32 P] dCTP 標識したDNAプローブとハイブリダイズさせた。Cx26のプローブとしては翻訳領域のcDNA断片を用いた。PCR法によって以下のコネキシンを検出するためのプローブを作製した。コネキシン32 (Dev. Biol., 146, 117-130, 1991, 塩基番号50-582)、コネキシン37 (J. Cell. Biol., 114, 1049-1057, 1991, 塩基番号73-940)、コネキシン40 (J. Cell. Biol., 117, 1299-1310, 1992, 塩基番号154-826)、コネキシン43 (GenBank accession no. X61576, 塩基番号458-1075)。mRNA量を標準化するために用いるプローブ β -アクチンとGAPDHは上述と同様の方法で調製した。ブロッティング膜は最終的に50 $^{\circ}$ C、0.1 \times SSC、0.1% SDS で洗浄して露光した。定量化はBAS 2000 システム (フジフィルム株式会社製) を用いて行った。図1 aで示すように、F10およびBL6細胞において、Cx26のmRNAの発現が検出でき、BL6細胞において、発現が5~10倍上昇していることが分かった。これに対して、他のコネキシンの発現レベルは検出限界以下だった。

【0026】(3) F10とBL6細胞におけるCx26タンパク質の発現

抗Cx26抗体を用いて単一な24kDaのCx26タンパク質が検出された(図1 bの右のパネルにおいて矢印で表示した)。等量のタンパク質が展開されていることはゲルの銀染色によって確認された(図1 bの左のパネル)。この抗Cx26抗体を用いた実験から、F10およびBL6細胞におけるCx26タンパク質の発現は、mRNAの発現と関連するといえる。

【0027】〔実施例5〕下大静脈断片とメラノーマ細胞により構成される共培養系

(1) メラノーマと血管細胞とのギャップ結合細胞間コミュニケーション (GJIC) 活性の差異

新鮮なネズミ下大静脈断片を切開し、カバーガラスに貼り付け、F10またはBL6細胞をその上に播いて共培養した。4時間後、F10 (図2 aの左のパネル) またはBL6 (図2 aの右のパネル) との共培養物を抗Cx26抗体と反応させ、蛍光顕微鏡により観察した。矢印は細胞膜近くのCx26の局在を示している。BL6細胞において顕著な免疫染色像が見られたが、F10細胞では観察されなかった。免疫染色の大部分はBL6細胞の細胞質に広く分布していたが、BL6の細胞膜にも観察された。これらの結果から、BL6と静脈細胞との間の異常なギャップ結合が形成されたことが示唆された。

【0028】(2) 色素-トランスファーアッセイ

色素-トランスファーアッセイは以下の手順で行った。細胞膜透過性蛍光色素 BCECF acetoxymethyl ester (同仁社製) を最終濃度 1 μ M となるように増殖期のメラノーマ細胞を培養している培地に添加し、3時間培養後、新鮮な増殖培地に取り換え、さらに1時間培養する。この細胞を集め、3回PBSで洗浄した後、色素-トランスファーアッセイに用いた。ギャップ結合細胞間コミュニケーション (GJIC) 能はMesnil等の方法 (M. Mesnil et al. Vol. 55, 629-639, 1995) に従い評価した。メラノーマ細胞と静脈片との共培養を行なうために、屠殺直後のマウスから胸郭部位の下大静脈を摘出した。静脈を縦方向に切開してその内面を露出させた。液状接着剤 (小西社製) を周囲の組織に滴下することにより、この切開した静脈片の内面を上方にしてカバーガラスに接着させた。つぎにこのカバーガラスを培養皿の底面に置き、BCECF標識した1 \times 10⁶個のメラノーマ細胞を含む増殖培地で満たした。共培養物を一定時間経過後に、4% パラホルムアルデヒド・0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.2を用いて固定し、直接、コンフォーカル・レーザー走査型顕微鏡を用いて、暗視野における蛍光を観察した。組織学的な観察にはBCECF標識していないメラノーマ細胞を用いて同様な手順で共培養を行った。BCECFでラベルしたF10およびBL6細胞を下大静脈断片上へ播いた上記の色素-トランスファーアッセイにより、BL6と静脈細胞との間の異常なギャップ結合形成の確認を行った。4時間後、共培養物を蛍光顕微鏡により観察した。BCECFの転移は矢印で示す(図2 b)。BL6細胞からは色素が転移し、血管表面が染色されたが、F10細胞からの色素の転移は見られなかった。2時間後(図2 cの上のパネル)と4時間後(図2 cの下のパネル)の色素の拡がりを共培養上で共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。矢印の先はBCECF標識F10細胞とBL6細胞を示す。2時間後は、F10またはBL6のいずれから色素の転移はほとんど見られなかった。4時間後は、いくつかのBL6細胞は周囲の細胞へ、色素を転移させていることが分かった(図2 cの右下のパネル)。転移したBCECFで染色された細胞は、丸石状に配置し、BL6細胞から血管内皮細胞への効率的な色素の転移が起こったことが示された。4時間後500個のBCECF標識細胞を観察した時、血管内皮細胞と色素の共役を認める細胞数を計測した。約20の細胞が色素を周囲の血管内皮細胞に転移させていた(図3)。一方、観察したすべてのF10細胞は、4時間後でさえもBCECFを、細胞質中に保持していた(図2 c左下のパネル)。

【0029】(3) 野生型および変異Cx26、コネキシン32のトランスフェクションによって得られた変異F10のGJIC活性の測定

Cx26とGJIC能との関連性を明らかにするために、野生型Cx26に対しドミナントネガティブの効果を示すことが知られている (A. Dufrot-Dancer et al. Oncogene Vol. 15, 2151-2158, 1997)、次の変異体を発現するベクター

をF10 (あるいはBL6) に形質転換し、G-418 耐性株を選択して形質転換体を得た。

F10-Cx26^{C60F}

(60位のシステインをフェニルアラニンへ置換)

F10-Cx26^{P87L}

(87位のプロリンをロイシンへ置換)

F10-Cx26^{R143W}

(143位のアルギニンをトリプトファンへ置換)

野生型および変異Cx26、コネキシン32のトランスフェクションによって得られたF10変異体について、(2)に記載した方法によりGJIC活性を測定した。野生型Cx26(F10-Cx26^{WT}-1および-2)でトランスフェクションしたF10細胞の2つの独立したクローンはBL6と同じく効率的に色素を血管内皮細胞へ転移させた(図3)。これに対してF10-Cx26^{C60F}およびF10-Cx26^{R143W}細胞は、血管内皮細胞のGJIC活性を持たないことが確認された。F10-Cx26^{P87L}細胞はわずかに活性が見られた(図3)。この系におけるドミナントネガティブ効果をテストするために、Cx26^{R143W}のcDNAを、BL6細胞へ導入した(BL6-Cx26^{R143W}-1および-2)。その結果、予想どおり、血管内皮細胞のGJIC活性がほとんど見られなかった(図3)。Cx26とコネキシン32との間でヘテロ型ギャップ結合能を示すことから、コネキシン32cDNAでトランスフェクションしたF10クローンは、血管内皮細胞のギャップ結合形成能があると思われたが、F10-Cx26^{WT}-1および-2の両クローンともギャップ結合形成能が見られなかった(図3)。このことからCx26が、血管内皮細胞とのギャップ結合能に特別な役割を果たしていることが確認された。

【0030】(4) BCECFで標識した細胞との共培養6時間経過後の観察結果

共培養を6時間に延長すると、F10細胞の細胞質における蛍光強度は、4時間時に観察したときと同じであったことから、F10細胞は、色素結合能欠損であることが示唆された(図4a)。対照的に、下部大静脈(IVC)表面に接着しているBL6の大部分の蛍光強度は、弱くなったことから、BL6と血管内皮細胞との間の効率的な色素結合能が示唆された(図4b)。特に、IVC表面にある扁平な形のBL6細胞では、蛍光強度が、大きく減少した。いくつかのBL6細胞は血管内皮細胞上に浸入する表現型を示した。血管内皮細胞の下に浸入したBL6細胞は、完全に蛍光を失うので、蛍光顕微鏡では検知することができなかった(図4c)。

【0031】〔実施例6〕形質転換細胞の自然転移の解析

(1) 自然転移アッセイ

2.5 × 10⁵ 個の細胞 (F10, BL6 およびそれらのトランスフェクタント細胞株) を、4週齢のオスの C57BL/6 マウス (7匹/1クローン) のフットパッドに皮下注射した。腫瘍の大きさは2日ごとに直接直径を計測してモニターした。3週後、(その時腫瘍は直径 8-10 mm に達

している) 腫瘍のある方の脚を切断する。その後マウスを4週間生かしたのち、解剖を行ない、両側の肺に形成された転移性のコロニー数を計測した。

【0032】(2) 解析結果

図3で使用したメラノーマ細胞、およびそのトランスフェクションした細胞を、マウスのフットパッドへ皮下注射した。二ヶ月後、もとのBL6細胞は高度に転移したが、もとのF10およびベクターでトランスフェクションしたF10細胞(F10-pAP3neo-1および-2)は、ほとんど転移していなかった(図5)。色素結合能のあるF10クローン(F10-Cx26^{WT}-1および-2)は、BL6細胞と同じく高い転移を示した。2つの転移性F10クローンによって作られたコロニーは、無色に見え、BL6細胞によって作られた全てのコロニーが、濃い黒色であったのとは対照的であった(図6)。色素結合能欠損F10クローンであるF10-Cx26^{C60F}、F10-Cx26^{P87L}、F10-Cx26^{R143W}、F10-Cx26^{WT}-1および-2は、ほとんど転移しなかった(図5)。しかし、色素結合能欠損BL6クローンであるBL6-Cx26^{R143W}-1および-2は、もとのBL6細胞と同じくらの転移性のコロニーを形成した(図5)。

【0033】〔実施例7〕ヒト肺小細胞癌におけるCx26のRNAの発現

(1) ヒト肺癌サンプル

兵庫成人病センターにおいて1991年から1997年において、標準的な手術(第一次と第二次リンパ節の完全廓清手術を含めた)を受けた肺小細胞癌の23人の患者を対象とした。再切除された標本は慎重にInternational Staging System for Lung Cancer (C. F. Mountain and C. M. Dresler Chest Vol.111, 1718-1723, 1997) にしたがって癌の進行ステージが決定された。癌組織はRNA抽出に用いるまで凍結保存した。

(2) ヒト肺小細胞癌におけるCx26のRNAの発現量の測定結果

実際にCx26がヒトの癌において転移を促進するかどうかを調べるために、ヒト肺小細胞癌(SCC)でのCx26のmRNAの発現を調べた。23人のSCCの患者は、リンパ節の切開を含む類似の手術を受けた。臨床病理的な段階では、全ての患者でM値は0であった。TおよびN値に基づいて、患者を3つの群、低転移群(T2N0; n=11)、中転移群(T2N1; n=4)、高転移群(T2N2; n=8)に分けた。原発性の腫瘍から抽出した全RNAを、ノーザンブロットによって解析した(図7)。高転移群へ属する8つのケース中2つのケースにおいて、顕著なCx26のmRNAの発現を検出した。発現量のレベルは、GAPDHの発現を利用した濃度補正後、BL6細胞の発現量レベルに匹敵した。対照的に、低および中転移群に属する全てのケースでは、Cx26のmRNA発現量は、F10細胞における発現量よりも低かった。

【0034】

【発明の効果】本発明により、癌の転移能を評価するた

めの新しい指標が提供される。コネキシン26が細胞同士の結合に関与するタンパク質であることから、癌の転移を構成する複数の段階の中で、特に癌細胞の他組織への付着と浸潤の過程に関与していることが推測される。したがって、コネキシン26を指標とすることにより、転移における重要なステップについて、癌の持つ転移能を定量的に把握することが可能となる。一方、本発明による癌転移抑制薬のスクリーニング方法においては、癌にとっては転移のために不可欠なステップを支える重要な要素の一つと思われるコネキシン26を標的とすることにより、癌の転移を効果的に抑制することができる化合物の探索が可能となる。本発明のスクリーニングによってもたらされるコネキシン26の結合活性を阻害する化合物は、癌の転移を抑制する薬剤として有用である。

この薬剤は、本発明の癌転移能の検査方法と組み合わせて、コネキシン26の発現レベルの高い癌に対して用いることによって、転移の予防を効果的に達成することができる。本発明によって、コネキシン26は癌細胞の中でも転移能の非常に高いメラノーマの皮下移植モデル（自然転移系）において直接的に転移に関与していることが示された。またヒト肺小細胞癌のなかでコネキシン26の発現が亢進している例が認められた。以上のことから、コネキシン26は迅速な治療を必要とする高転移性の癌細胞において静脈内への浸潤に関与していることを示唆しており、従来癌治療成績がもっとも悪いタイプの癌の早期診断や抗転移治療に結びつくと考えられる。

【0035】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories co., Ltd.
 <120> Method for Testing Cancer Metastasis Ability, and Screening of Drug for Inhibiting of Cancer Metastasis.
 <130> MB-105
 <140>
 <141>
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 2311
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (199)..(876)
 <400> 1
 gatttaatcc tatgacaaac taagttggtt ctgtcttcac ctgttttggg gaggttgtgt 60
 aagagttggt gtttctcag gaagagattt aagcatgctt gcttaccag actcagagaa 120
 gtctccctgt tcgtcctag ctatgttcct gtgttgtgtg cattcgtctt ttccagagca 180
 aaccgcccag agtagaag atg gat tgg ggc acg ctg cag acg atc ctg ggg 231
 Met Asp Trp Gly Thr Leu Gln Thr Ile Leu Gly
 1 5 10
 ggt gtg aac aaa cac tcc acc agc att gga aag atc tgg ctc acc gtc 279
 Gly Val Asn Lys His Ser Thr Ser Ile Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val
 15 20 25
 ctc ttc att ttt cgc att atg atc ctc gtt gtg gct gca aag gag gtg 327
 Leu Phe Ile Phe Arg Ile Met Ile Leu Val Val Ala Ala Lys Glu Val
 30 35 40
 tgg gga gat gag cag gcc gac ttt gtc tgc aac acc ctg cag cca ggc 375
 Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly
 45 50 55
 tgc aag aac gtg tgc tac gat cac tac ttc ccc atc tcc cac atc cgg 423
 Cys Lys Asn Val Cys Tyr Asp His Tyr Phe Pro Ile Ser His Ile Arg
 60 65 70 75
 cta tgg gcc ctg cag ctg atc ttc gtg tcc agc cca gcg ctc cta gtg 471

Leu Trp Ala Leu Gln Leu Ile Phe Val Ser Ser Pro Ala Leu Leu Val
 80 85 90
 gcc atg cac gtg gcc tac cgg aga cat gag aag aag agg aag ttc atc 519
 Ala Met His Val Ala Tyr Arg Arg His Glu Lys Lys Arg Lys Phe Ile
 95 100 105
 aag ggg gag ata aag agt gaa ttt aag gac atc gag gag atc aaa acc 567
 Lys Gly Glu Ile Lys Ser Glu Phe Lys Asp Ile Glu Glu Ile Lys Thr
 110 115 120
 cag aag gtc cgc atc gaa ggc tcc ctg tgg tgg acc tac aca agc agc 615
 Gln Lys Val Arg Ile Glu Gly Ser Leu Trp Trp Thr Tyr Thr Ser Ser
 125 130 135
 atc ttc ttc cgg gtc atc ttc gaa gcc gcc ttc atg tac gtc ttc tat 663
 Ile Phe Phe Arg Val Ile Phe Glu Ala Ala Phe Met Tyr Val Phe Tyr
 140 145 150 155
 gtc atg tac gac ggc ttc tcc atg cag cgg ctg gtg aag tgc aac gcc 711
 Val Met Tyr Asp Gly Phe Ser Met Gln Arg Leu Val Lys Cys Asn Ala
 160 165 170
 tgg cct tgt ccc aac act gtg gac tgc ttt gtg tcc cgg ccc acg gag 759
 Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu
 175 180 185

 aag act gtc ttc aca gtg ttc atg att gca gtg tct gga att tgc atc 807
 Lys Thr Val Phe Thr Val Phe Met Ile Ala Val Ser Gly Ile Cys Ile
 190 195 200
 ctg ctg aat gtc act gaa ttg tgt tat ttg cta att aga tat tgt tct 855
 Leu Leu Asn Val Thr Glu Leu Cys Tyr Leu Leu Ile Arg Tyr Cys Ser
 205 210 215
 ggg aag tca aaa aag cca gtt taacgcattg ccagttgtt agattaagaa 906
 Gly Lys Ser Lys Lys Pro Val
 220 225
 atagacagca tgagaggat gaggaaccc gtgctcagct gtcaaggctc agtcgccagc 966
 atttcccaac acaaagattc tgaccttaaa tgcaaccatt tgaacccct gtaggcctca 1026
 ggtgaaactc cagatgccac aatgagctct gctccctaa agcctcaaaa caaaggccta 1086
 attctatgcc tgtcttaatt ttctttcact taagttagtt ccaactgagac ccaggctgt 1146
 taggggttat tgggtgaagg tactttcata ttttaaacag aggatatcgg catttgtttc 1206
 ttctctgag gacaagagaa aaaagccagg ttccacagag gacacagaga aggtttgggt 1266
 gtctctctgg ggttctttt gccaaatttc ccacgttaa aggtgaacat tggttcttc 1326
 atttgcttg gaagtttta tctctaacag tggacaaagt taccagtgcc ttaactctg 1386

 ttacactttt tggaagtga aactttgtag tatgataggt tattttgatg taaagatgtt 1446
 ctggatacca ttatatgttc cccctgttc agaggctcag attgtaatat gtaaatgta 1506
 tgcattcgc tactatgatt taatttgaaa tatggtcttt tggttatgaa tactttgcag 1566
 cacagctgag agaggctgtc tgttgattc atttgtgtca tagcacctaa caacattgta 1626
 gcctcaatcg agtgagacag actagaagtt cctagtggc ttatgatagc aaatggcctc 1686
 atgtcaaata ttagatgtaa ttttgttaa gaaatacaga ctggatgtac caccaactac 1746
 tacctgtaat gacaggcctg tccaacacat ctccctttc catgctgtgg tagccagcat 1806
 cggaaagaac gctgatttaa agaggtgagc ttgggaattt tattgacaca gtaccattta 1866
 atggggagac aaaaatgggg gccaggggag ggagaagttt ctgtcgttaa aaacgagttt 1926
 ggaaagactg gactctaaat tctgttgatt aaagatgagc tttgtctacc ttcaaaagtt 1986
 tgtttggctt acccccttca gctccaatt ttttaagtga aaatataact aataacatgt 2046

gaaaagaata gaagctaagg tttagataaa tattgagcag atctatagga agattgaacc 2106
 tgaatattgc cattatgctt gacatggtt ccaaaaaatg gtactccaca tacttcagtg 2166
 aggtaagta ttttctgtt gtcaagaata gcattgtaaa agcattttgt aataataaag 2226
 aatagcttta atgatatgct tgtaactaaa ataattttgt aatgtatcaa atacatttaa 2286

aacattaaaa tataatctct ataat 2311

<210> 2

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Asp	Trp	Gly	Thr	Leu	Gln	Thr	Ile	Leu	Gly	Gly	Val	Asn	Lys	His
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Ile	Gly	Lys	Ile	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Phe	Ile	Phe	Arg
			20				25						30		
Ile	Met	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Lys	Glu	Val	Trp	Gly	Asp	Glu	Gln
			35				40						45		
Ala	Asp	Phe	Val	Cys	Asn	Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Cys	Lys	Asn	Val	Cys
			50				55						60		
Tyr	Asp	His	Tyr	Phe	Pro	Ile	Ser	His	Ile	Arg	Leu	Trp	Ala	Leu	Gln
					70					75					80
Leu	Ile	Phe	Val	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Met	His	Val	Ala	
					85				90					95	
Tyr	Arg	Arg	His	Glu	Lys	Lys	Arg	Lys	Phe	Ile	Lys	Gly	Glu	Ile	Lys
					100				105					110	
Ser	Glu	Phe	Lys	Asp	Ile	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Gln	Lys	Val	Arg	Ile
					115				120					125	
Glu	Gly	Ser	Leu	Trp	Trp	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ile	Phe	Phe	Arg	Val
					130				135					140	
Ile	Phe	Glu	Ala	Ala	Phe	Met	Tyr	Val	Phe	Tyr	Val	Met	Tyr	Asp	Gly
					145				150					155	160
Phe	Ser	Met	Gln	Arg	Leu	Val	Lys	Cys	Asn	Ala	Trp	Pro	Cys	Pro	Asn
					165				170					175	
Thr	Val	Asp	Cys	Phe	Val	Ser	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Phe	Thr
					180				185					190	
Val	Phe	Met	Ile	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	Ile	Leu	Leu	Asn	Val	Thr
					195				200					205	
Glu	Leu	Cys	Tyr	Leu	Leu	Ile	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Lys	Ser	Lys	Lys
					210				215					220	

Pro Val

225

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gcgaattcag gtgtaaattt accaaaaata

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 4
 gcgctcgagc acccaagctt tccatcctgg

30

【図面の簡単な説明】

【図1】F10およびBL6細胞におけるCx26の発現レベルを示すノーザンブロット法の結果を示す図。

(a) Cx26、Cx32、Cx43、Cx37、およびCx40の転写を検出するノーザンブロット解析の結果を示す。マウスの肝臓、心臓、それに肺組織から抽出した全RNAも陽性対照としてブロットした。

(b) F10およびBL6細胞におけるCx26タンパク質の発現を示す。抗Cx26抗体は、約24kDaのモノマーCx26タンパク質を検出した(右パネルの矢印が示している)。同等のタンパク質がローディングされていることが、ゲルの銀染色から確認された(左の写真)。

【図2】血管内皮組織から成る共培養システム、および血管内皮組織上に蒔いたメラノーマ細胞の顕微鏡観察画像を示す図。バーは20μmを示す。

(a) 4時間後、F10細胞(左の写真)あるいはBL6細胞(右の写真)との共培養は、抗Cx26抗体によって免疫反応が起こり、蛍光顕微鏡で観察された。矢印は細胞膜付近のCx26を示している。

(b) BCECFで標識したF10細胞(左の写真)あるいはBL6細胞(右の写真)を血管内皮組織に蒔いた。共培養は4時間後に打ち切り、蛍光顕微鏡で観察を行った。BCECFの共役をくさびで表す。

(c) 共培養の2時間後(上段の写真)と4時間後(下段の写真)に、染色の広がりを共焦点レーザー走査顕微鏡により観察した。蛍光強度は色で表示し、赤は青よりも強いことを示している。くさびは、BCECFで標識されたF10細胞およびBL6細胞を示す。

【図3】ギャップ結合アッセイの結果をまとめたグラフ。共培養開始後4時間でBCECFで標識した細胞500個が観察され、そのとき内皮細胞に色素の共役を示す細胞数を計測した。データは3回の独立した試験の平均を示した。バーは標準誤差を表す。*は、F10細胞から得た値と比較した場合の検定による $p<0.01$ を示す。

【図4】共培養開始後6時間目にBCECFで標識した細胞と

の共培養を観察した顕微鏡観察画像を示す図。血管内皮組織は、蛍光顕微鏡(左の写真)、およびH&E染色後に光学顕微鏡(右の写真)で直接観察した。バーは20μmを示す。

(a) BCECFで標識したF10細胞との共培養の結果を示す。F10細胞のいくつかは血管内皮組織表面に広がっているが観察された(くさびで示す)。F10細胞の蛍光強度は、共培養4時間後でも強く観察された。

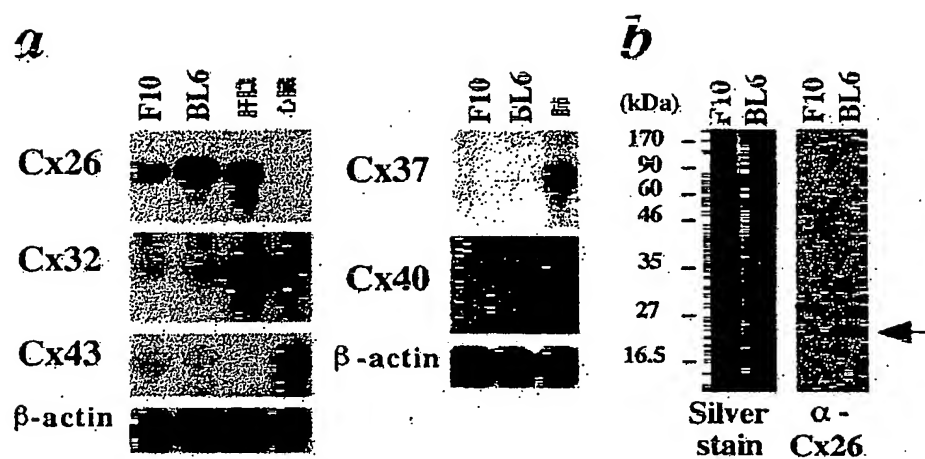
(b) BCECF標識したBL6細胞との共培養を示す。BL6細胞の蛍光強度は4時間の共培養の場合に比べ、段々と弱くなっていった。これは特に血管内皮組織表面にある扁平な形のBL6細胞に顕著に現れた(bにくさびで示す)。cの右の写真のくさびは、内皮細胞の直ぐ下に侵入しているBL6細胞を示している(矢印で示す)。しかし、H&Eで染色する前に蛍光顕微鏡で、同様なBL6細胞を発見するのは困難である(cの左の写真にくさびで示す)。

【図5】Cx26 形質転換細胞の自然転移の解析結果をまとめたグラフ。マウスをF10細胞あるいはBL6細胞、またはそれぞれ異なる形状のCx26やCx32でトランスフェクトした細胞で処理したときに、肺で作られた転移コロニーの数を示す。肺の重量も計測した。データは1クローンあたり7マウスの平均を示している。バーは標準誤差を表す。*はF10細胞から得た値と比較した場合の検定による $p<0.05$ を示す。

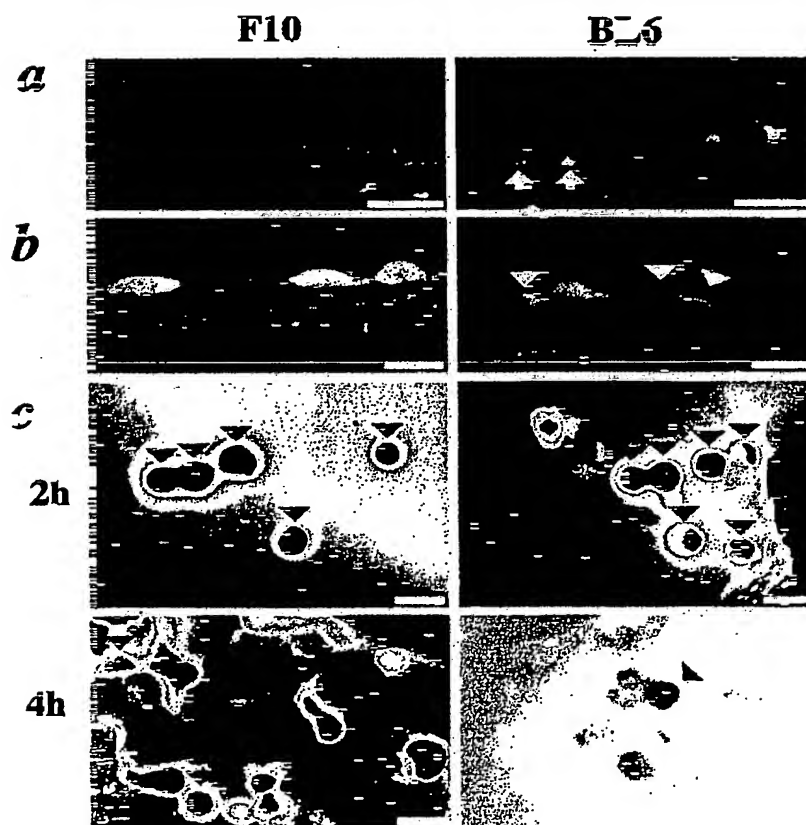
【図6】Cx26 形質転換細胞の自然転移病巣を示す顕微鏡観察画像を示す図。F10細胞(上段の写真)、BL6細胞(中段の写真)それにF10-Cx26WT-1細胞(下段の写真)によって、肺に転移したコロニーの例を示す。

【図7】ヒト肺小細胞癌におけるコネキシン26 mRNAの発現を分析したノーザンブロット法の結果を示す図。癌試料は、それぞれのN値に基づいて3グループに分割した。F10細胞およびBL6細胞から得た全RNAもブロットした。RNA量は、GAPDHプローブで標準化した。分化の病理上の程度はW、良好；M、適切；P、不良、と表した。

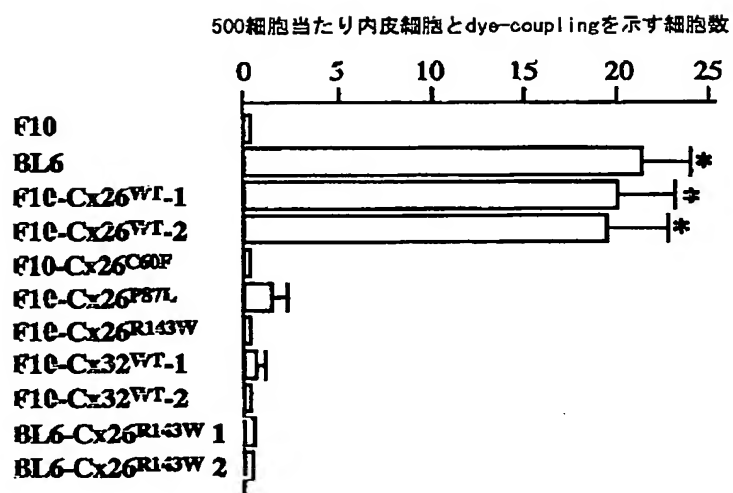
【図1】



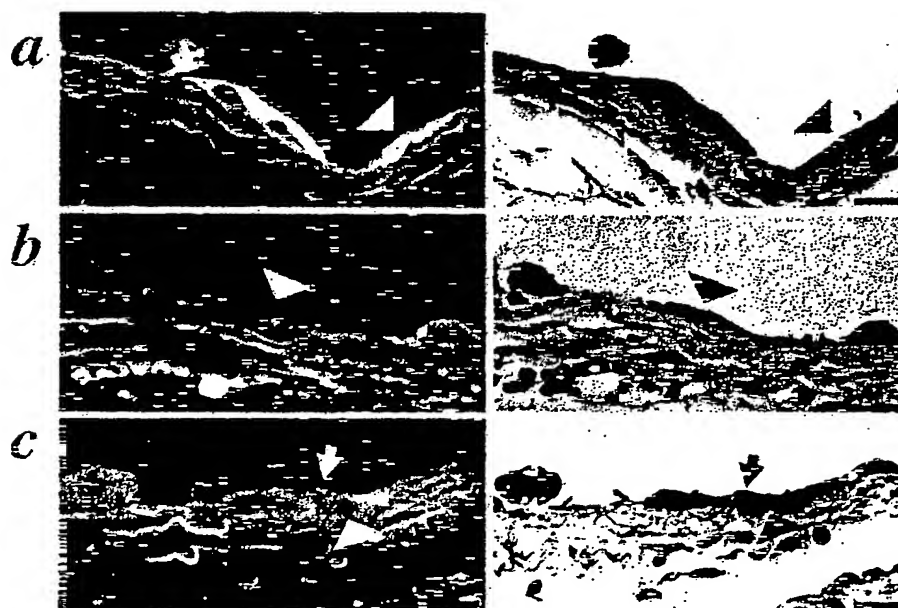
【図2】



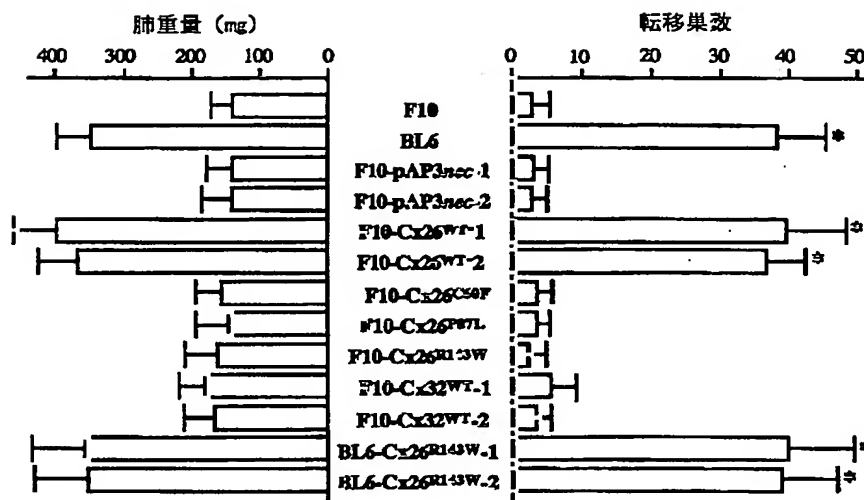
【図3】



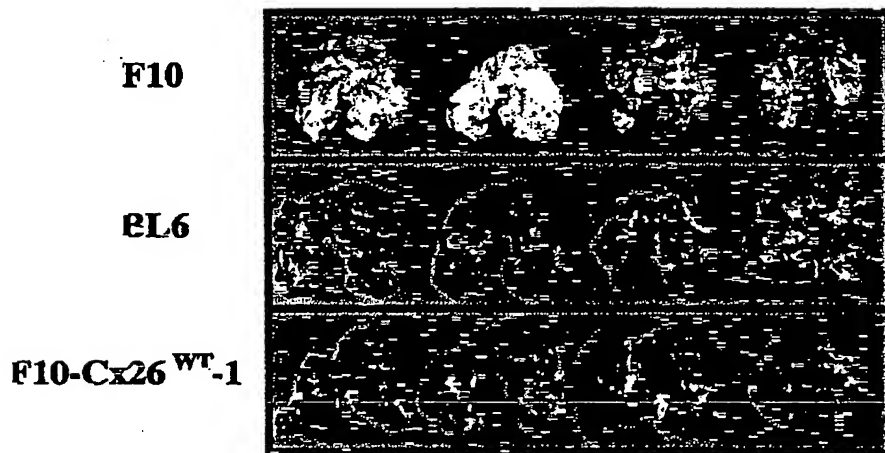
【図4】



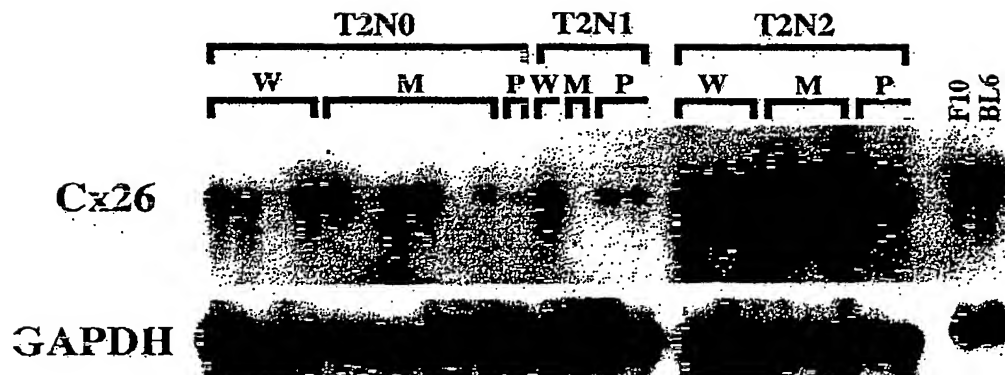
【図5】



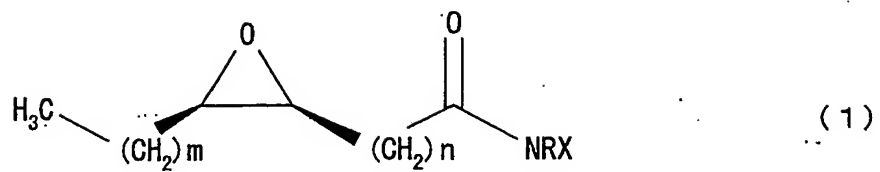
【図6】



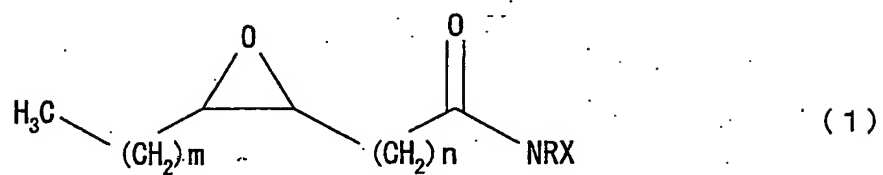
【図7】



出願時・1回目補正書



2回目補正書



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)